

# Tema 1: Conceptos básicos de evolución molecular y genómica microbiana

Introducción a la Filoinformática: Pan-genómica y Filogenómica – Diplomado en Bioinformática, Univ. Autónoma de Sinaloa, Oct. 2021  
[http://econtinua.uas.edu.mx/diplomados/2510-2700-18\\_001.htm](http://econtinua.uas.edu.mx/diplomados/2510-2700-18_001.htm)

Pablo Vinuesa ([vinuesa@ccg.unam.mx](mailto:vinuesa@ccg.unam.mx); [@pvinmex](mailto:@pvinmex))  
Centro de Ciencias Genómicas, (CCG-UNAM), Campus Morelos,  
Cuernavaca, México <http://www.ccg.unam.mx/~vinuesa/>

Todo el material del curso (presentaciones, tutoriales y datos) lo encontrarás en:  
[https://github.com/vinuesa/intro-filoinfo\\_UAS](https://github.com/vinuesa/intro-filoinfo_UAS)



## • Tema 1: conceptos básicos de evolución molecular y genómica microbiana

- Relación entre filogenética y evolución molecular
- Concepto y tipos de homología
- Árboles de genes vs. árboles de especies
- Fundamentos de genómica microbiana y consideraciones para la selección de marcadores
- Marcadores moleculares y tasas de evolución
- Protocolo básico de análisis filogenético
- Clasificación de métodos de inferencia filogenética
- Tipos de árboles y su enraizamiento
- Reconstrucción y evolución de caracteres sobre filogenias

Introducción a la filoinformática – pan-genómica y filogenómica. Diplomado en Bioinformática UAS 2021  
[https://github.com/vinuesa/intro-filoinfo\\_UAS](https://github.com/vinuesa/intro-filoinfo_UAS)

## Parte I: Introducción a la Inferencia Filogenética

### Conceptos básicos:

- \* filogenia, evolución molecular, homología y (pan)genómica microbiana
- \* tasas de evolución y selección de marcadores moleculares

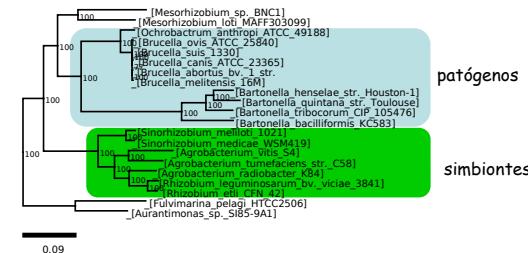
### Libros de referencia recomendados:

- Felsenstein, J., 2004. Inferring phylogenies. Sinauer Associates, INC., Sunderland, MA.
- Futuyma, D.J. 2017. Evolution, 4th Ed. Sinauer Associates, INC., Sunderland, MA.
- Graur, D., Li, W.H., 2000. Fundamentals of Molecular Evolution. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- Lemey P., Salemi M., Vandamme A.-M. 2010. The phylogenetic Handbook. Cambridge Univ. Press. UK
- Keith, Jonathan M. (Ed.) Bioinformatics: Volume I: Data, Sequence Analysis, and Evolution (Methods in Molecular Biology) <https://www.springer.com/gp/book/9781493966202>
- Nei, M., Kumar, S., 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, Inc., NY.
- Page, R.D.M., Holmes, E.C., 1998. Molecular Evolution - A Phylogenetic Approach. Blackwell Science Ltd, Oxford.
- Yang, Z., 2014. Molecular Evolution – a statistical approach. Oxford University Press, Oxford, UK

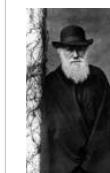
## La relación entre filogenética y evolución molecular:

- La filogenética tiene por objetivo el trazar la relación ancestro descendiente de los organismos (árbol filogenético) a diferentes niveles taxonómicos, incluyendo el árbol universal, haciendo una reconstrucción de esta historia de ancestría en base a **caracteres homólogos**, tanto **morfológicos** como **moleculares**.

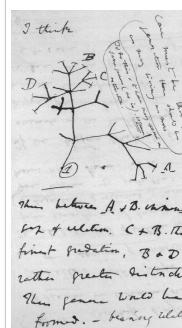
Las hipótesis filogenéticas resultantes son la base para hacer **predicciones** (inferencias) sobre propiedades biológicas de los grupos revelados por la filogenia mediante el mapeo de caracteres sobre la topología (hipótesis evolutiva). También proveen el contexto comparativo para poder inferir patrones de **evolución molecular**.



## Evolución de la filogenética como disciplina científica



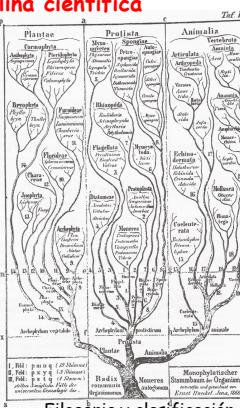
Los primeros intentos de reconstruir la historia filogenética no estaban basados en criterios objetivos.



Reflejaban las ideas o hipótesis plausibles generadas por expertos de grupos taxonómicos particulares.

La mayor parte de la 1a. mitad del SXIX los sistemáticos estaban más preocupados por el problema de definir a las especies biológicas, descubrir mecanismos de especiación y la variación geográfica de las especies, que en entender su filogenia.

No fue hasta los 40's y 50's del siglo pasado que los esfuerzos de Walter Zimmermann y Willi Henning comenzaron a definir métodos objetivos para reconstruir filogenias en base a caracteres compartidos entre organismos fósiles y contemporáneos.



Licencia Creative Commons 4.0, no comercial  
Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

## ¿Porqué estudiar filogenética y evolución molecular?

Corolario I:

"Nothing in biology makes sense except in the light of evolution"

- Theodosius Dobzhanski, 1973  
(*The American Biology Teacher* 35:125)

Corolario II:

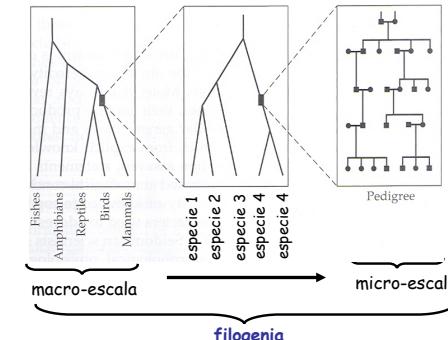
"Nothing in evolutionary biology makes sense except in the light of a phylogeny"

- Jeff Palmer, Douglas Soltis, Mark Chase, 2004  
(*American J. Botany* 91: 1437-1445)



## El concepto de filogenia y homología: definiciones básicas

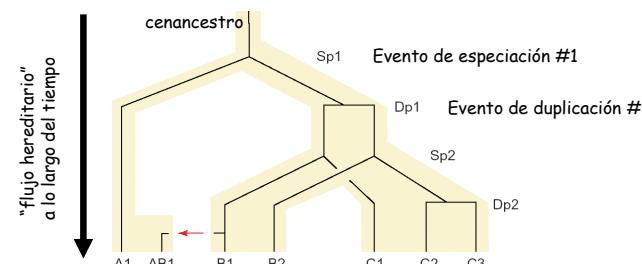
"The stream of heredity makes phylogeny; in a sense, it is phylogeny. Complete genetic analysis would provide the most priceless data for the mapping of this stream".  
G.G. Simpson (1945)



**Filogenia:** historia evolutiva del flujo hereditario a distintos niveles evolutivos/temporales, desde la genealogía de genes en poblaciones (micro-escala; dominio de la genética de poblaciones) hasta el árbol universal (macro-escala)

## El concepto de homología: definiciones básicas

Subtipos de homología: ortología, paralogía y xenología



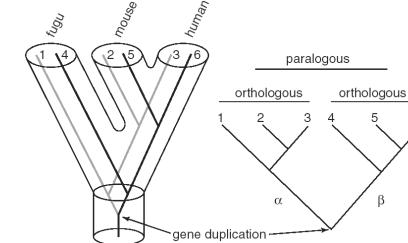
**ortología:** relación entre secuencias en la que la divergencia acontece tras un evento de especiación. El ancestro común es el cenáncestro. La filogenia recuperada de estas secuencias refleja la filogenia de las especies.

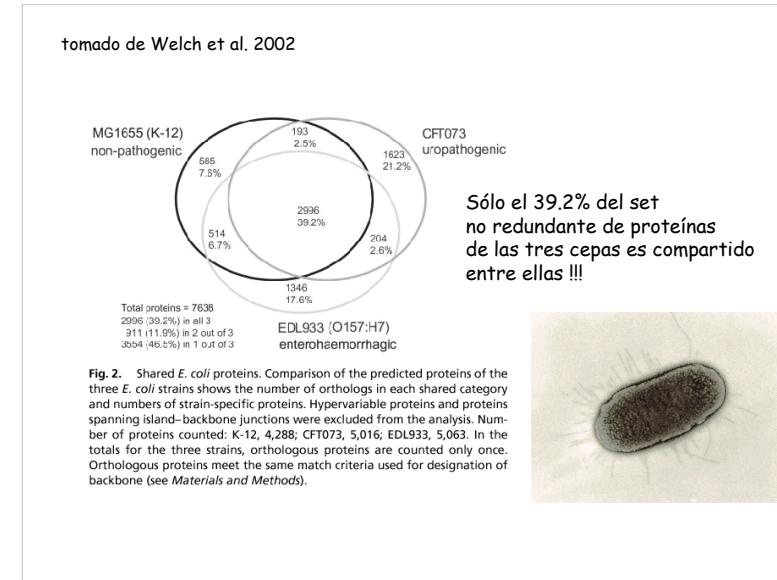
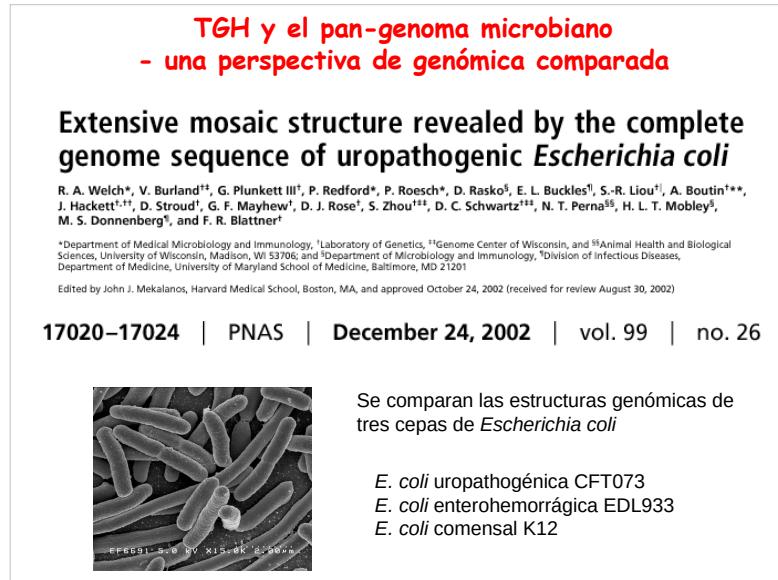
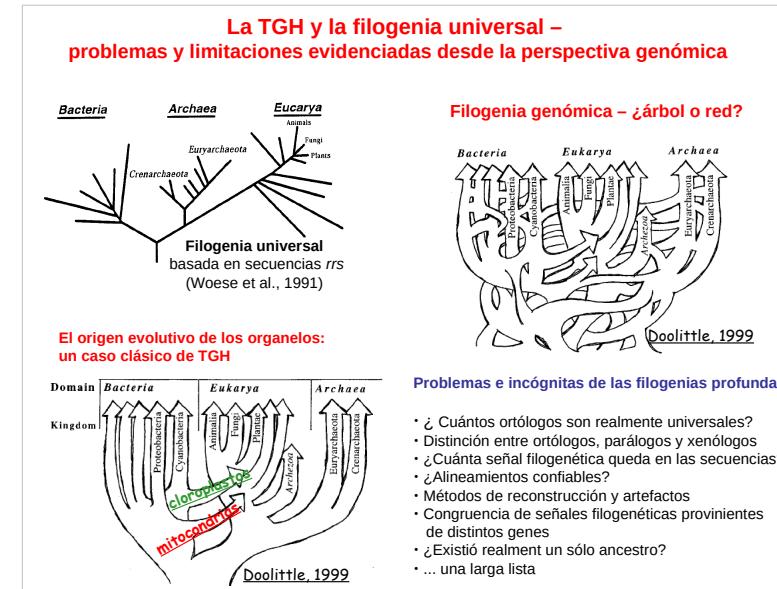
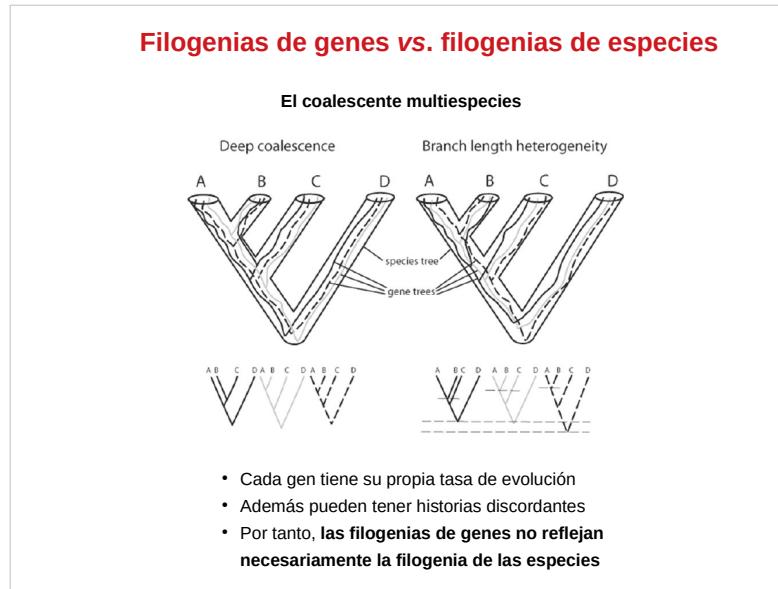
**paralogía:** condición evolutiva en la que la divergencia observada acontece tras un evento de duplicación génica. La mezcla de ortólogos y parálogos en un mismo análisis filogenético recupera la filogenia correcta de los genes pero no necesariamente la de los organismos o taxa.

**xenología:** relación entre secuencias dada por un evento de transferencia horizontal entre linajes. Distorsiona fuertemente la filogenia de las especies.

## Arboles de genes vs. árboles de especies - el problema de la definición de relaciones de homología

- **La filogenia de especies** puede ser inferida erróneamente cuando se reconstruye en base a secuencias parálogas y no se muestran todas las copias (p. ej. si muestreamos sólo las copias 1, 3 y 5) eq ((fugu, human), mouse) !!!
- Más compleja aún es la estima de la filogenia de especies si ha habido pérdida diferencial de parálogos en los distintos linajes a comparar
- Por tanto la inferencia de una filogenia de especies se realizará preferentemente usando ortólogos de copia única





# Tema 1: Conceptos básicos de evolución molecular y genómica microbiana

tomado de Welch et al. 2002

## Islands and evidences for their horizontal transfer

-85% (52 out of 61) of island codons have a significantly different codon usage vs. backbone

-EDL and CFTshare only 10% of island genes, but >98% identity among backbone encoded proteins in the 3-strain comparison

-CFT and EDL strains contain 60 and 57 islands >4 kb, most of them at the same relative positions with respect to backbone markers, although island contents are unrelated

- 12 CFT073 and 10 EDL933 islands are closely associated to tRNA genes

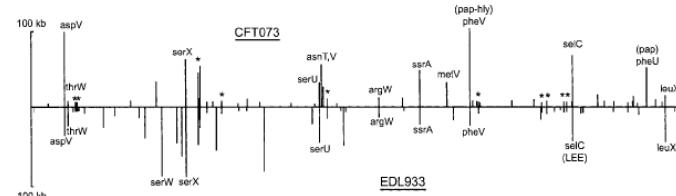


Fig. 3. Locations and sizes of CFT073 and EDL933 islands. Island size, vertical axis; position in colinear backbone, horizontal axis. All islands >4 kb are shown. Islands located at tRNAs are indicated by tRNA labels. One tmRNA (ssrA) is also an insertion target. \*, CFT073 and EDL933 islands in the same backbone location but not near tRNAs.

Introducción a la filoinformática – pan-genómica y filogenómica. Diplomado en Bioinformática UAS 2021  
[https://github.com/vinuesa/intro-filoinfo\\_UAS](https://github.com/vinuesa/intro-filoinfo_UAS)

## Corolario:

A la luz de estos resultados queda evidenciado que ha de ejercerse un gran cuidado a la hora de seleccionar genes para la reconstrucción de filogenias de especies bacterias.

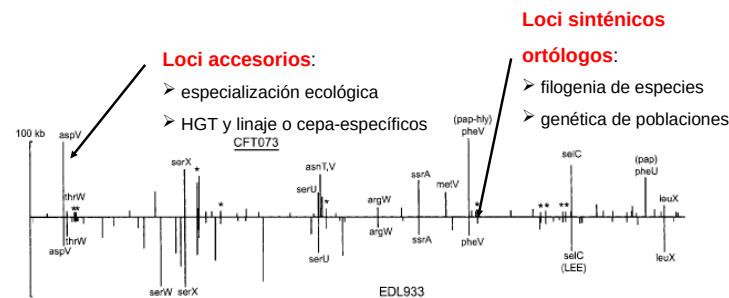


Fig. 3. Locations and sizes of CFT073 and EDL933 islands. Island size, vertical axis; position in colinear backbone, horizontal axis. All islands >4 kb are shown. Islands located at tRNAs are indicated by tRNA labels. One tmRNA (ssrA) is also an insertion target. \*, CFT073 and EDL933 islands in the same backbone location but not near tRNAs.

## El pangenoma microbiano: pangenomas abiertos y cerrados genoma core y accesorio

The microbial pan-genome  
Duccio Medini<sup>1</sup>, Claudio Donati<sup>1</sup>, Hervé Tettelin<sup>2</sup>, Vega Masignani<sup>1</sup> and  
Rino Rappuoli<sup>1</sup>

Current Opinion in Genetics & Development 2005, 15:589–594

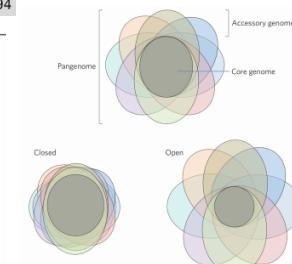
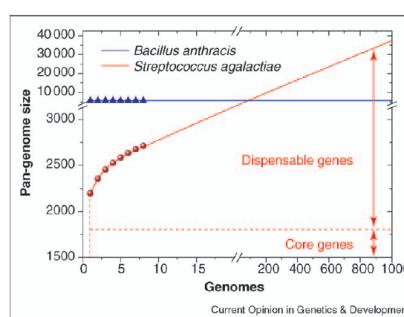


Figure 1 | Schematic representation of pangenomes as Venn diagrams. Species differ in the sizes of their pangenomes, with larger, more open pangenomes correlating with larger long-term effective population sizes and the ability to migrate.

McInerney et al. 2017 Nat. Micro.

## Inferencia filogenética: los detalles (básicos)

Datos moleculares en filogenética: tasas y restricciones evolutivas

El protocolo básico para un análisis filogenético de secuencias moleculares

Determinación de homología entre múltiples secuencias: slineamientos múltiples

Clasificación de métodos filogenéticos

Tipos de árboles filogenéticos y su "anatomía"

Evolución de caracteres

# Tema 1: Conceptos básicos de evolución molecular y genómica microbiana

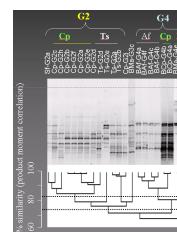
Introducción a la filoinformática – pan-genómica y filogenómica. Diplomado en Bioinformática UAS 2021  
[https://github.com/vinuesa/intro-filoinfo\\_UAS](https://github.com/vinuesa/intro-filoinfo_UAS)

## Marcadores moleculares usados en filogenética y evolución molecular

### Polimorfismos de DNA y proteínas

#### I) Marcadores dominantes (# secuencias)

- RFLPs
- Fingerprints genómicos (AFLPs, RAPDs, Rep-PCR, SINEs SSCP, NSNPs ...)
- Análisis multilocus de isoenzimas
- etc ...



Los datos moleculares revelan información genética. Sólo datos con una base genética son de interés en filogenética y evolución. De ahí que los marcadores moleculares son generalmente los favorecidos para hacer inferencias filogenéticas y evolutivas a distintos niveles taxonómicos.

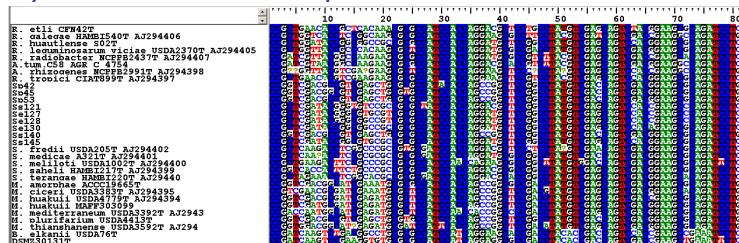
Los caracteres fenotípicos muchas veces tienen una base genética menos clara y están gobernados por las interacciones de muchos genes con el ambiente. Muchos fenotipos presentan gran plasticidad, es decir, que un mismo genotipo puede presentar una gradación de fenotipos. Esta variación fenotípica puede confundir las verdaderas relaciones filogenéticas y determinación de parentescos.

El uso de protocolos de PCR permite acceder a todo el mundo biológico para escrutinios genéticos

Los métodos moleculares permiten una fácil y robusta distinción entre homología y analogía y permiten hacer comparaciones de divergencia evolutiva usando métricos universales

## Marcadores moleculares usados en filogenética y evolución molecular

### II) Secuencias moleculares DNA/proteína



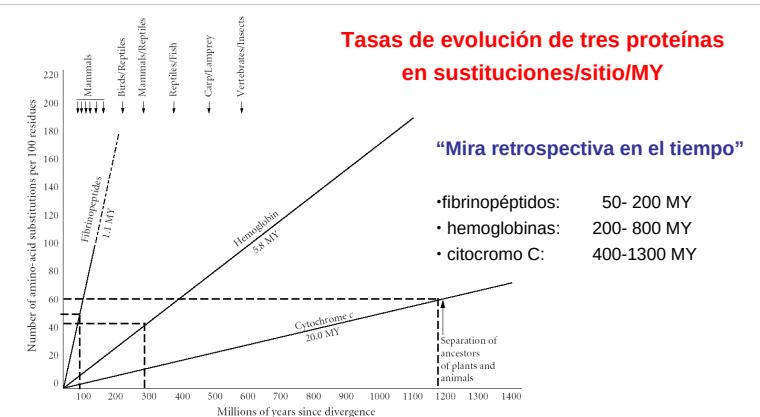
- La premisa fundamental en evol. molec. es que en dichas secuencias se encuentra escrita una buena parte de su historia evolutiva.
- Secuencias de DNA representan el “nivel anatómico” más fino de un organismo
- Buena parte de la biología moderna tiene por objetivo revelar la información contenida en secuencias moleculares
- Para inferir la historia de relaciones de ancestría entre un conjunto de secuencias homólogas hemos de **determinar las correspondencias de homología entre los caracteres** haciendo un **alineamiento múltiple de las secuencias**

## Selección de marcadores adecuados para hacer inferencias evolutivas a distintos niveles de profundidad filogenética

### Restricciones funcionales vs. tasas de sustitución:

- Existe gran variabilidad en la tasa de sustitución entre genes y dominios génicos:
  - intrones vs. exones
  - regiones codificadoras vs. regiones intergénicas o pseudogenes
  - residuos catalíticos vs. no catalíticos, dominios estructurales vs. no estructurales
  - 3as. posiciones vs. 1as y 2as en codones de secuencias codificadoras,
  - asas vs. orquillas en rRNAs y tRNAs ...
- Existen genes de evolución muy rápida o muy lenta:
  - fibrinopéptidos evolucionan una tasa x900 > a la de ubiquitina y x20 > citocromo C
  - genes de HIV evolucionan a  $\times 10^9$  veces la tasa de un gen humano promedio!
- Tasas de evolución y la teoría neutral de evolución molecular:

el reloj molecular, calibración y datación de eventos de especiación/extinción de linajes y de pandemias ...



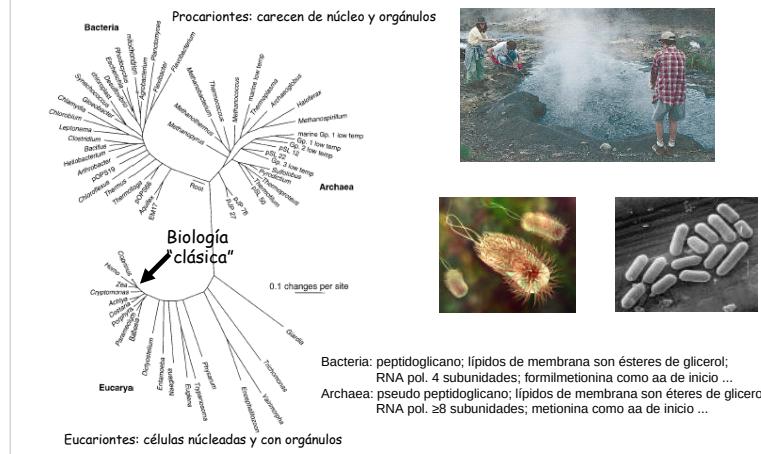
- Distintas proteínas presentan diversas tasas de sustitución. Así los fibrinopéptidos presentan relativamente pocas restricciones, presentando una elevada tasa de sustitución neutral. Citocromo C, en cambio, presenta mayores restricciones evolutivas y presenta una tasa de sustitución menor. La hipótesis del reloj molecular dice que esta tasa, para ciertas proteínas, es constante en distintos linajes.

(de Hartl y Clark, 1997. Principles of Population Genetics, Sinauer)

# Tema 1: Conceptos básicos de evolución molecular y genómica microbiana

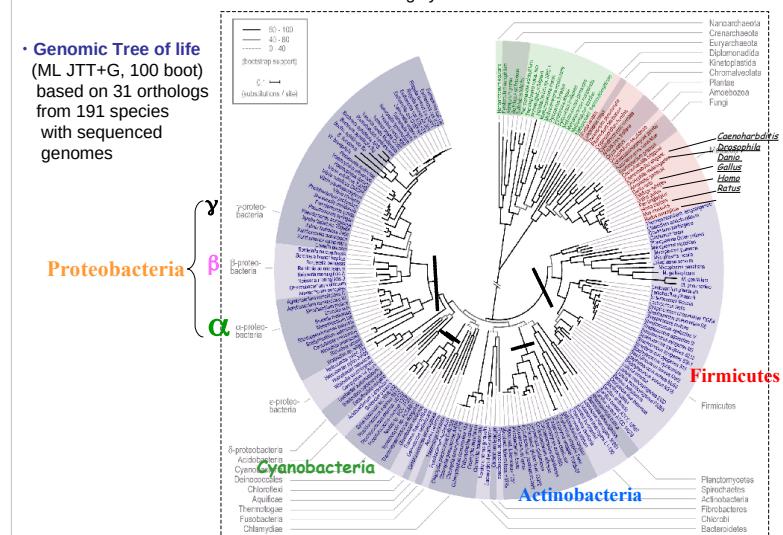
## Aplicaciones y predicciones filogenéticas (I)

- Elucidación del árbol universal, sistemática bacteriana y la identificación/clasificación de microorganismos ambientales (cultivables y NO CULTIVABLES > 90-99%)  
*rsr: un marcador lento*



Introducción a la filoinformática – pan-genómica y filogenómica. Diplomado en Bioinformática UAS 2021  
[https://github.com/vinuesa/intro-filoinfo\\_UAS](https://github.com/vinuesa/intro-filoinfo_UAS)

Ciccarelli et al. 2006 Science 311:1283-87 – Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life



## Aplicaciones y predicciones filogenéticas (II):

Evidencia molecular de transmisión de HIV-1 en un caso criminal usando genes de evol. rápida

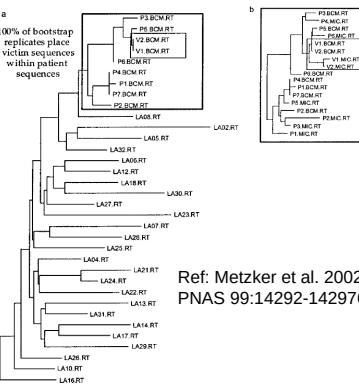
Un gastroenterólogo fue acusado del intento de asesinato en 2º grado de su novia mediante inyección de sangre contaminada con HIV-1.

Este estudio representa el primer caso en el que reconstrucciones filogenéticas de secuencias (paciente P, víctima V y controles LA de portadores en la población) fueron admitidas en una corte criminal en EUA.

Las filogenias de RT y de env mostraron que las secuencias de la V compartían ancestría directa en forma de paralogía con las de una P del gastroenterólogo.

Análisis de posiciones de codones de la RT de la V revelaron genotipos consistentes con mutaciones que confieren AZTR, similares a las presentadas en la P.

El establecimiento a priori de la P y V como posible par de transmisión del HIV-1 representó una clara hipótesis para ser evaluada en marcos de estadística filogenética.



Ref: Metzker et al. 2002  
PNAS 99:14292-142976

Filogenias del gen RT basadas en secuencias de la V, la P y LA, obtenidas por dos labs. independientes.

- Baylor College of Medicine, Houston, TX (BMC)
- Dpt. Ecology and Evol. Biol., Univ. Michigan (MIC)

## Protocolo básico para un análisis filogenético de secuencias moleculares

## Colección de secuencias homólogas

- BLAST, diamond

## Alineamiento múltiple de secuencia

- Clustal, mafft, muscl

## Análisis evolutivo del alineamiento y selección del modelo de sustitución más ajustado

- ↓ · homogeneidad composicional, saturación  
· selección de modelos, ...

## Estima filogenética

- NJ, ME, MP, ML, Bayes ...

## Pruebas de confiabilidad de la topología inferida

- proporciones de bootstrap  
probabilidad posterior ...

## Interpretación evolutiva y aplicación de las filogenias

Licencia Creative Commons 4.0, no comercial  
Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

# Tema 1: Conceptos básicos de evolución molecular y genómica microbiana

## Homología entre secuencias de DNA: alineamientos múltiples

- A lo largo de la evolución las secuencias descendientes de otra ancestral van acumulando diversos tipos de mutaciones. Estas son **mutaciones puntuales** o **reorganizaciones genómicas**, que pueden involucrar  **inserciones, delecciones, inversiones, translocaciones o duplicaciones**, mediados por distintos mecanismos de recombinación (homóloga e ilegítima)
- Cualquier análisis filogenético y/o evolutivo de secuencias moleculares requiere de un **alineamiento** para poder comparar sitios homólogos entre las secuencias a estudiar. Para ello se escriben las secuencias en filas una sobre la otra, de modo que los sitios homólogos quedan alineados por columnas. Cada sitio o columna del alineamiento corresponde a un **caracter**, y los nt o aa que ocupan dichas posiciones representan los distintos **estados del carácter**

Introducción a la filoinformática – pan-genómica y filogenómica. Diplomado en Bioinformática UAS 2021  
[https://github.com/vinuesa/intro-filoinfo\\_UAS](https://github.com/vinuesa/intro-filoinfo_UAS)

## Inferencia Filogenética - introducción

- La **inferencia de relaciones filogenéticas** a partir de secs. moleculares requiere de la selección de uno de los muchos métodos disponibles
- Con frecuencia la inferencia filogenética es considerada como una "caja negra" en la que "entran las secuencias y salen los árboles" (filogenias estimadas con MEGA)

• **Objetivos de esta taller son:**

- desarrollar un marco conceptual para entender los fundamentos teóricos (filosóficos) que distinguen a los distintos métodos de inferencia (clasificación de métodos)
- presentar el uso de **modelos y suposiciones** en filogenética
- manejo empírico de diversos paquetes de software para inferencia filogenética bajo diversos criterios

## Inferencia filogenética molecular - clasificación de métodos

- Podemos clasificar a los métodos de reconstrucción filogenética en base al **tipo de datos** que emplean (**caracteres discretos vs. distancias**) y si usan un **método algorítmico** o **un criterio de optimización** para encontrar la topología

Método de reconstrucción	distancias	caracteres discretos
criterio de agrupamiento	UPGMA Neighbour joining	X
criterio de optimización	Evolución mínima Máxima parsimonia Máxima verosimilitud	

## Métodos de reconstrucción filogenética – una clasificación

### I.- Tipos de datos: distancias vs. caracteres discretos

- Los **métodos de distancia** primero convierten los alineamientos de secuencias en una matriz de distancias genéticas en base al modelo evolutivo seleccionado, la cual es usada por el método algorítmico de reconstrucción para calcular el árbol (**UPGMA y NJ**)
- Los **métodos discretos (MP, ML, Bayesianos)** consideran cada sitio del alineamiento (o una función probabilística para cada sitio) directamente

- Un set de 4 secs. y la matriz de distancias correspondiente
- Un árbol de parsimonia y uno de distancias para este set de datos produce topologías y longitudes de ramas idénticas
- La diferencia radica en que el árbol de parsimonia identifica qué sitio del alineamiento contribuye cada paso mutacional en la longitud de cada rama

# Tema 1: Conceptos básicos de evolución molecular y genómica microbiana

Introducción a la filoinformática – pan-genómica y filogenómica. Diplomado en Bioinformática UAS 2021  
[https://github.com/vinuesa/intro-filoinfo\\_UAS](https://github.com/vinuesa/intro-filoinfo_UAS)

### Arboles filogenéticos: una introducción al bosque (I) terminología y conceptos básicos: anatomía de un árbol

- Definición: Un árbol filogenético es una estructura matemática usada para representar la historia evolutiva (relaciones de ancestro-descendiente) entre un grupo de secuencias o organismos. Dicho patrón de relaciones históricas es la estima hecha de la filogenia o árbol evolutivo.

• Anatomía básica de un árbol

árbol no enraizado, sin direccionalidad

árbol enraizado, con direccionalidad, que indica relaciones ancestro-descendiente (((humano, chimp), gorila), orang)

- reconstrucción de caracteres ancestrales
- longitud de ramas
- soporte o confianza en splits

### Arboles filogenéticos: una introducción al bosque (II) enraizamiento de árboles

- La mayoría de los métodos de reconstrucción estiman árboles no enraizados, por lo que no distinguen entre las 5 posibles topologías enraizadas generables a partir de 4 OTUs.
- Para enraizar un árbol (decidir cuál topología es la que refleja el proceso evolutivo), necesitamos información biológica adicional

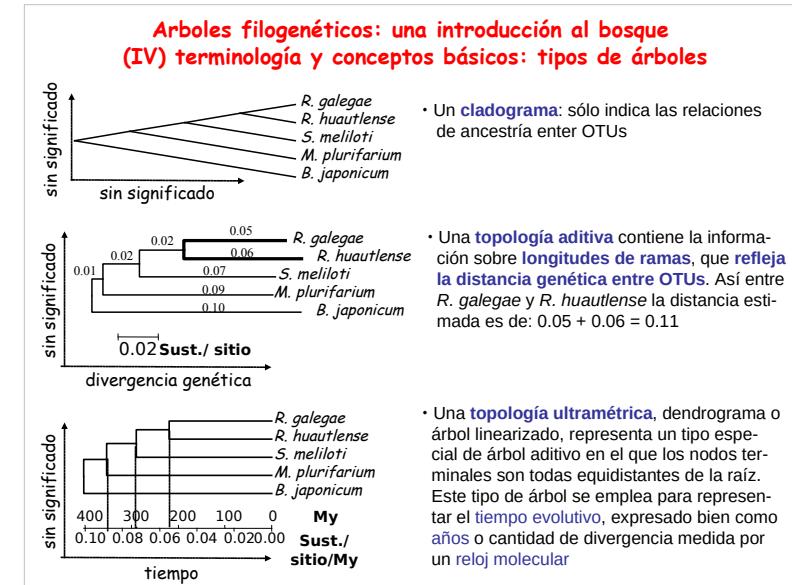
Tres métodos usados para el enraizado de árboles:  
a) **grupo externo** - (invertebrado) a grupo interno (vertebrados)  
b) **punto medio** – se pone la raíz en el punto intermedio del camino más largo del árbol  
c) **duplicación génica** – enraizamos en el nodo que separa a las copias parálogas

### Arboles filogenéticos: una introducción al bosque (III) terminología y conceptos básicos

- Los árboles son como móviles: las ramas pueden rotarse sobre sí mismas sin afectar a las relaciones entre los OTUs; (((A,B),C),D),E) se puede representar como:

- Los árboles presentan distintos grados de resolución

topología **estrella**      topología **parcialmente resuelta**      topología **totalmente resuelta**



# Tema 1: Conceptos básicos de evolución molecular y genómica microbiana

Introducción a la filoinformática – pan-genómica y filogenómica. Diplomado en Bioinformática UAS 2021  
[https://github.com/vinuesa/intro-filoinfo\\_UAS](https://github.com/vinuesa/intro-filoinfo_UAS)

